

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-175805

(43)Date of publication of application : 08.07.1997

(51)Int.CI.

C01B 25/32
B01J 20/04
B01J 20/28
G01N 30/48

(21)Application number : 08-235854

(71)Applicant : ASAHI OPTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 19.08.1996

(72)Inventor : TAGAYA NORIAKI
KUWABARA HIDEYUKI
HASHIMOTO TAKAO
KOMATSU NORIKO
FUKAMACHI KEIKO
MAEJIMA TSUGIO
ISHIKAWA TOSHIHIRO
OGAWA TETSURO

(54) CALCIUM PHOSPHATE-BASED HYDROXYAPATITE FOR CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new calcium phosphate-based hydroxyapatite for a chromatographic separation having a peculiar crystalline characteristic and excellent in separating capability and selectivity.

SOLUTION: This calcium phosphate-based hydroxyapatite for a chromatographic separation is obtained by burning a powdery calcium phosphate-based hydroxyapatite or a granulated calcium phosphate-based hydroxyapatite obtained by granulating a gel state calcium phosphate-based hydroxyapatite in a temperature range of 400–700° C to make the crystal structure of the hydroxyapatite belonging to the hexagonal system and having unit lattice constants of $9.58 \pm 0.08 \text{ \AA}$ in a-axis and $7.00 \pm 0.5 \text{ \AA}$ in c-axis.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 19.08.1996

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than withdrawal
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application] 24.06.1997

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

特開平9-175805

(43)公開日 平成9年(1997)7月8日

(51)Int.C1.⁶ 識別記号
 C01B 25/32
 B01J 20/04
 20/28
 G01N 30/48

F I
 C01B 25/32 P
 B01J 20/04 A
 20/28 Z
 G01N 30/48 C
 G

審査請求 有 発明の数 2 FD (全10頁)

(21)出願番号 特願平8-235854
 (62)分割の表示 特願昭60-209562の分割
 (22)出願日 昭和60年(1985)9月23日

(71)出願人 000000527
 旭光学工業株式会社
 東京都板橋区前野町2丁目36番9号
 (72)発明者 多賀谷 宣秋
 埼玉県川越市大字笠幡2735番地4
 (72)発明者 桑原 秀行
 埼玉県入間郡大井町亀久保1902番地の5
 (72)発明者 橋本 孝雄
 埼玉県入間郡大井町亀久保1902番地の5
 (72)発明者 小松 紀子
 埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡177番地11
 (74)代理人 弁理士 倉橋 喫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】クロマトグラフィー分離用リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイト及びその製造方法

(57)【要約】

【課題】 特異な結晶特性を有し、分離能及び選択性に優れた新規なクロマトグラフィー分離用リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイトを提供することである。

【解決手段】 粉末状リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイトを、又はゲル状リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイトを造粒して得た粒状のリン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイト造粒体を、400°C~700°Cの範囲の温度で焼成することにより、ヒドロキシアバタイトの結晶構造を、六方晶系に属し、単位格子定数はa軸が9.58±0.08Åであり、c軸が7.00±0.05Åとした。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 六方晶系に属し、単位格子定数はa軸が9.58±0.08Åであり、c軸が7.00±0.05Åであることを特徴とするクロマトグラafi一分離用リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイト。

【請求項2】 粉末状リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイトを、又はゲル状リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイトを造粒して得た粒状のリン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイト造粒体を、400°C~700°Cの範囲の温度で焼成し、六方晶系に属し、単位格子定数はa軸が9.58±0.08Åであり、c軸が7.00±0.05Åであるクロマトグラafi一分離用リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイトを得ることを特徴とするクロマトグラafi一分離用リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイトの製造方法。

【請求項3】 焼成温度は500°C~600°Cの範囲の温度である特許請求の範囲第2項記載の製造方法。

【請求項4】 リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイト造粒体の焼成は、酸素又は空気の存在下において該造粒体を所定時間加熱することによつて行なわれる特許請求の範囲第2項または第3項記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、クロマトグラafi一分離用リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイト及びその製造方法に関するものである。

【0002】 更に詳しく言えば、本発明は、特定の結晶特性を有し、生体高分子化合物の分離用カラム充填剤として有用な新規のリン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイト及びその製造方法に関するものである。

【0003】

【従来の技術】 アバタイト構造化合物は、一般に、 $M_{1-x} (ZO_4)_x \cdot X$ で表わされる化合物であり、この式でMは、Ca、Ba、Sn、Mg、Na、K、Pb、Cd、Zn、Ni、Fe及びAl等の金属原子を表わし、 ZO_4 は、 PO_4 、 AsO_4 、 VO_4 、 SO_4 、及び SiO_4 等の酸根を表わし、Xは、OH、Fの原子(団)を表わす広範囲な化合物群の総称である。本発明においては、上記一般式においてMが実質上Caであり、 ZO_4 が実質上 PO_4 であり、Xが実質上OHであるリン酸カルシウム系化合物を対象とする。

【0004】 リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイト $Ca_{1-x} (PO_4)_x (OH)_x$ (以下特別の場合を除き単に「ヒドロキシアバタイト」という。) は、脊椎動物の歯や骨の無機成分の組成と近似し、生体との親和性が良好なため近年人工歯、人工骨材料の医療用材料として注目を集めている。又、生体親和性を有することから生体高分子化合物、例えばタンパク質、酵素、核酸等のクロマトグラafi一分離用カラム充填剤として用いられている。

【0005】 従来、斯るヒドロキシアバタイトは、主として①水溶性カルシウム塩とリン酸塩とを水溶液中で反応させる水溶液反応利用による湿式合成法によるか、②リン酸カルシウムと炭酸カルシウムとを水蒸気の存在下において900°C~1400°Cの温度で反応させる高温固相反応利用による湿式合成法によるか、又は、③りん酸水素カルシウムを例えば200°C、15気圧で加水分解する高温高圧水蒸気下での反応による水熱合成法を利用するか、によつて合成されている。

10 【0006】 更に、これらの方のほかに、例えば、特公昭55-500447号で開示されている合成法が提案されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 上記の如き方法により得られるヒドロキシアバタイトは、結晶構造では六方晶系に属し、空間群は $P\bar{6}_3/m$ であり単位格子定数はa軸が9.432Å、c軸が6.881Åである (M. I. Kay及びR. A. Young; ネイチャー (Nature, 204, p. 1050 (Dec. 12, 1964))。

【0008】 本発明者等は、多くの研究実験の結果、このような結晶特性を有するヒドロキシアバタイトは生体高分子化合物のクロマトグラafi一分離用カラム充填剤として使用した場合に十分な分離能及び選択性を常時得ることができないことを見出した。

【0009】 従つて、本発明の目的は、従来提案されているヒドロキシアバタイトを生体高分子化合物のクロマトグラafi一分離用カラム充填剤として使用した場合の分離能及び選択性に難点があることに鑑み、特異な結晶特性を有し、分離能及び選択性に優れた新規なクロマトグラafi一分離用リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイトアバタイトを提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、アバタイト構造化合物の結晶特性について種々検討した結果、X線回折 (XRD) 法により求められる単位格子定数が従来の当該技術分野において知られているアバタイト構造化合物とは相違する新規な結晶構造を有するヒドロキシアバタイトを見出し、当該化合物が前記の如く、特に生体高分子化合物のクロマトグラafi一分離用カラム充填剤として極めて有用であることを見出し本発明を完成了。

【0011】 即ち、本発明は、六方晶系に属し、空間群が $P\bar{6}_3/m$ であり、単位格子定数は、a軸が9.58±0.08Å、c軸が7.00±0.05Åであることを特徴とするヒドロキシアバタイトである。又、本発明によると、特に分離能及び選択性に優れた新規なクロマトグラafi一分離用リン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイトが提供される。

50 【0012】 ここで、単位格子とは、結晶が種々の原

子、原子団や分子が三次元的に規則正しく配列したものであり、その繰り返しの最小単位の単位胞を意味する。該単位胞の幾何学的対称性は晶系と空間群で記述され、単位胞の大きさは格子定数で表わされる。アバタイト構造化合物の単位胞は、六方格子で表わされ、この中に例えばCa²⁺、PO₄³⁻、OH⁻が配列している。

【0013】前述の如き、従来開示されているアバタイト構造化合物、例えばリン酸カルシウム系ヒドロキシアバタイトの単位格子定数は、a軸が9.432 Åであり、c軸が6.881 Åである。

【0014】これに対し、本発明によるヒドロキシアバタイトの単位格子定数は、a軸が9.58±0.08 Åであり、c軸が7.00±0.05 Åであつて、上記従来のヒドロキシアバタイトとは結晶特性が全く相違するものであり、斯る構造のヒドロキシアバタイトは従来知られていない新規なものである。

【0015】前述の単位格子定数は、X線回折法により求めることができる。具体的には、粉末X線回折法により回折角（プラック角）を測定する。回折角は、ティフ

$$\sin^2 \theta = \frac{1}{3} \left(\frac{\lambda}{a} \right)^2 (h^2 + k^2 + hk) + \left(\frac{\lambda}{2c} \right)^2 l^2$$

となる。

【0018】本発明によるヒドロキシアバタイトの単位格子定数a及びcは、上記の如くX線回折測定により求めた各回折線のプラック角及び既知のミラー指数を用いて上記の六方晶系の理論式より求めたものである。そして、単位格子定数a、cの最確値及び誤差の範囲は最小二乗法により決定される。表2に本発明によるヒドロキシアバタイトのX線回折結果から求めた格子面間隔d (Å)を示す。

【0019】本発明に係る単位格子定数のa軸が9.58±0.08 Å、c軸が7.00±0.05 Åであるヒドロキシアバタイトは、特に生体高分子化合物、例えばタンパク質の分離において顕著な性能を発揮する。単位格子定数が上記の値でない場合には分離性能が著しく低下する。

【0020】本発明の特定の範囲の単位格子定数（a及びc）を示すヒドロキシアバタイトが特に生体高分子化合物の分離において優れた性能を有する理由は明白ではないが、生体高分子化合物例えばDNAのような核酸又はタンパク質の分離においてヒドロキシアバタイト基質に存在する吸着点（吸着サイト）と核酸分子上のリン酸基との、又は該吸着点とタンパク質のアミノ基及びカルボキシル基との相互作用が重要な役割を演ずると言える。

【0021】ここで、ヒドロキシアバタイト結晶表面には結晶格子のa c又はb c面に平行な面（それれb面、a面と呼ぶ。これは結晶学的には等価である。）と、a b面に平行な面（c面と呼ぶ。）との2種類の面

ラクトメータ付のX線回折装置（CuK α 線）を用いて記録紙上に記録したX線回折图形から測定することができる。又、プラックの式 $\lambda = 2\alpha \sin \theta$ （ λ はCuK α 線の波長で1.54184 Å）からオングストローム単位で表示した格子面間隔d (Å) を求めることもできる。ヒドロキシアバタイトの結晶系は六方晶系であり、各格子面間隔d (Å) に対するミラー指数(h k l) が付されており、これは、JCPDS (粉末X線回折ファイル (Joint Committee on Powder Diffraction Standard) 9-432に示されている。格子面間隔d (Å) は、格子定数a、c及びミラー指数(h k l) で次式の如く表される。

【0016】

【数1】

$$d = \frac{1}{\sqrt{(4/3a^2)(h^2 + k^2 + hk) + (l^2/c^2)}}$$

又、プラックの式を用いるならば、

【0017】

【数2】

が主として出現する。更に、結晶のa面又はb面上には正の電荷を帯びた2個のカルシウムによって構成される吸着点（c吸着点と呼ぶ。）が配列し、結晶のc面上には負の電荷を帯びたリン酸イオンに由来する6個の酸素原子によって構成される吸着点（P吸着点と呼ぶ。）が配列しており、これらの配列の仕方は結晶であるが故に規則的であり単位面積当たりに存在する数も一定である。

従つて単位格子定数a、c（の値）が異なる場合、c吸着点間及びP吸着点間の距離に相違が出現することになる。

【0022】上述したように生体高分子化合物のクロマトグラフィー分離において、ヒドロキシアバタイトの吸着点と生体高分子化合物の種々の官能基との相互作用が重要であり、C吸着点間及びP吸着点間、或いは相互の吸着点間の距離が生体高分子化合物の吸着又は脱着等の相互作用に影響することは明らかであり、これら吸着点間にはある適切な距離が必要であつて、本発明の単位格子定数を有するヒドロキシアバタイトがこのような条件を満足しており生体高分子化合物分離において優れた性能を示すものと考えられる。

【0023】又、上述の如き特異な結晶特性を有した本発明に係るヒドロキシアバタイトは、その組成においてCaとPの原子比、つまりCa/Pが1.5~1.9であることが好ましい。

【0024】更に、本発明のクロマトグラフィー分離用カラム充填剤として有用なヒドロキシアバタイトは、前記の如くに特定の単位格子定数を有するのに加えて特定のビリジン吸着量を示すことが又特徴の一つである。即

ち、本発明者等の研究によると、ビリジン吸着量が0.003mmol/g～0.01mmol/gの範囲にあるものが、生体高分子化合物の分離において優れた性能を発揮することが分かつた。これは、前記の如きヒドロキシアバタイト基質と核酸分子上のリン酸基、タンパク質のアミノ基及びカルボキシル基との相互作用による吸脱着において重要な役割をなすOH⁻、Ca⁺⁺、PO₄³⁻の各官能基の、特にOH⁻の酸量が制御されることに起因するものと推定される。

【0025】ビリジン吸着量は、上記の如き官能基による固体酸量を主として表示するものであり、ビリジン吸着量が0.003mmol/gに満たない場合にはタンパク質の分離性能は低下し、実用に供することができない。一方、ビリジ吸着量が0.01mmol/gを越える場合も同様に分離性能は低下する。

【0026】本発明のヒドロキシアバタイトの第三の特徴は、針状微結晶を主体とする微結晶集合体であることであり、その大きさは、幅100Å～500Å、長さ500Å～3,000Åである。針状微結晶であることは球状体に造粒することが容易であり、通常球状体とされる微結晶集合体の平均粒径は面積基準で0.5μm～50μmであり、好ましくは1μm～10μmである。又、斯る球状体とされることは機械的強度が増大するという利点や分離カラム充填層を均一にできるという利点がある。

【0027】クロマトグラフィー分離の対象となり得るタンパク質としては、Immunoglobulin G、Transterin、Myeloma Immunoglobuline D、Serum albumin、Ovalbumin等を挙げることができる。

【0028】次に、本発明のヒドロキシアバタイトの製造方法について説明する。

【0029】本発明による製造方法は、前述のような溶液反応による湿式法、高温固相反応による乾式法又は加水分解による水熱法等の合成法より得られたゲル状ヒドロキシアバタイト又は粉末状ヒドロキシアバタイトを400℃～700℃の範囲の温度で焼成することによつても製造し得るが、好ましくは、先ずゲル状ヒドロキシアバタイトを造粒し、その結果生成された粒状ヒドロキシアバタイトを400℃～700℃の範囲の温度で焼成することによつて行なわれる。

【0030】本発明は、本発明者等が、アバタイト構造化合物の結晶特性と焼成温度との関係について種々検討した結果、アバタイト構造化合物の単位格子定数が焼成

| | |
|------------------|---------------|
| 粒径 (μm) | 0.5～50 |
| Ca/P比 | 1.5～1.9 |
| 粒形 | 球状 (針状微結晶集合体) |
| ビリジン吸着量 (mmol/g) | 0.003～0.01 |

【0036】

【発明の実施の形態】次に、本発明を実施例に即して説明する。

温度の上昇に伴い変化して増加し、約600℃未満で最大となり、更に焼成温度を上昇させると単位格子定数は再び収縮に転じるという新しい知見を得たことに基づいて完成されたものである。

【0031】ここで、ゲル状ヒドロキシアバタイトとは、水に、又はカルシウム、リン酸等のイオンを含有する水溶液にヒドロキシアバタイトの針状の微結晶体が共存している懸濁体状つまりスラリー状のものであり、前記の如きヒドロキシアバタイトの合成法のいずれかにより調製することができる。又、ゲル状ヒドロキシアバタイトは、微結晶粉末を水溶液に分散混合しても得ることができる。

【0032】ゲル状ヒドロキシアバタイトの好ましい造粒方法は、噴霧乾燥法 (スプレードライ法) である。噴霧乾燥法は、高温気流中にヒドロキシアバタイトの懸濁液又はスラリーを噴霧させて瞬間に乾燥させることを内容とする。噴霧乾燥の条件は、懸濁液又はスラリーの濃度が0.1重量%～20重量%、好ましくは、1重量%～10重量%であり、高温気流温度が100℃～200℃、好ましくは110℃～170℃の範囲にあることである。噴霧ノズルの形状、空気量等の条件は適宜選択することができる。この造粒処理の結果、約0.5μm～約50μmの範囲、更に約1μm～約20μmの範囲に制御された粒径を有する生成物を得ることができた。更には、造粒処理の仕方によつては約1μm～約10μmの範囲に制御された球状体を得ることができることが分かつた。

【0033】本発明の方法において、焼成処理は、ゲル状ヒドロキシアバタイトを加熱帶域において所定温度に昇温し、保持することによつて行なわれる。焼成温度は、400℃～700℃の範囲であり、更に、好ましい温度は500℃～600℃の範囲である。焼成時間は限定すべきものではないが0.1～20時間であり、好ましい焼成時間は、1～3時間である。焼成処理に際しては、酸素又は空気の存在下において乾燥を行なうことが好ましい。乾燥処理条件は、制限されるものではないが、80℃～120℃の範囲で時間0.1～10時間加熱することが好適である。

【0034】このようにゲル状ヒドロキシアバタイトを焼成して得られたヒドロキシアバタイトは、下記の如き特性値を有し、上述の如き特定の単位格子定数を有する従来知られていない新規な化合物である。

【0035】

| | |
|--|---------------|
| 粒径 (μm) | 0.5～50 |
| Ca/P比 | 1.5～1.9 |
| 粒形 | 球状 (針状微結晶集合体) |
| ビリジン吸着量 (mmol/g) | 0.003～0.01 |
| 【0036】実施例1 | |
| 11の三口フラスコに水酸化カルシウムの懸濁液 (95 | |
| 50 % Ca(OH) ₂ を15.6g及び蒸留水を400gか | |

ら成る。)を採り、窒素ガスを吹き込み、かつ強く攪拌しながらリン酸水溶液(8.5% H₃PO₄を13.8g及び蒸留水を400gから成る。)をゆつくりとした速度で添加した。添加終了後、これにリン酸水溶液を更に加えて、pHを8.2とし、オイルバスにセットし、90°Cで約18時間保持した。この結果白色の微結晶物を含有する生成物、即ちゲル状ヒドロキシアバタイトを得た。

【0038】これを冷却した後、一部を噴霧乾燥機(スプレードライヤー)にかけ、1μm~10μm程度の球状の顆粒即ち微結晶集合体を得た。

【0039】更に、これを100°Cで乾燥後、580°Cで焼成し分離カラム用の顆粒を調製した。この顆粒のX線回折法により求めた格子面間隔を表2に示す。この顆粒の特性値は次の通りであった。

(1) X線回折法により求めた単位格子定数;

$a = 9.58 \text{ \AA}$

$c = 7.01 \text{ \AA}$

(2) ヒリジン吸着量; 0.0056mmol/g

(3) Ca/P比; 1.67

X線回折は、理学電機製RAD-rDを使用し、次の測定条件を採用した。

【0040】出力: 40KV, 30mA

CuK α

DS/RS/SS: 1/6°C/0.15mm/1/6°C

プリセットタイム: 0.1秒

ステップ幅: 1/100

【0041】本実施例において、粒度分布は粒子濃度により吸光度が変化するという原理を利用した遠心沈降法を採用して吸光度を求め、ストークスの沈降式により粒径を求めた。測定に当たり、分散媒としては水を利用し、測定装置は堀場自動粒度分布測定装置(CAPA-300型)を用いた。

【0042】測定時のパラメータは次の通りであり、測

定結果は表1に示す通りであった。

【0043】測定時パラメータ

| | |
|---------|------------|
| 分散媒粘性係数 | 0.96センチボイス |
| 分散媒密度 | 1.00 g/ml |
| 試料密度 | 3.21 g/ml |
| 最大粒径 | 10 μm |
| 最小粒径 | 1.0 μm |
| 粒径間隔 | 1.0 μm |
| 測定時間 | 6.3 分間 |
| 回転数 | 500 rpm |

【0044】

【表1】

表 1

| | 粒径(μm) | 頻度分布(%) | 累積分布 |
|----|------------|---------|-------|
| | 0.00~1.00 | 14.9 | 14.9 |
| | 1.00~2.00 | 19.4 | 34.3 |
| 20 | 2.00~3.00 | 18.3 | 52.6 |
| | 3.00~4.00 | 13.2 | 65.8 |
| | 4.00~5.00 | 8.8 | 74.6 |
| | 5.00~6.00 | 7.0 | 81.6 |
| | 6.00~7.00 | 5.2 | 86.8 |
| | 7.00~8.00 | 3.9 | 90.7 |
| | 8.00~9.00 | 2.5 | 93.2 |
| | 9.00~10.00 | 1.2 | 94.4 |
| 30 | 10.00< | 5.6 | 100.0 |

粒径のメジアン 2.86μm

【0045】

【表2】

表 2

| ミラー指数 $h \cdot k \cdot l$ | 格子面間隔 d (Å) | | | | |
|------------------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|
| | 実施例1 | 実施例2 | 実施例3 | 比較例1 | 比較例2 |
| 0 0 2 | 3.503 | 3.480 | 3.495 | 3.440 | 3.461 |
| 1 0 2 | 3.227 | 3.206 | 3.219 | 3.169 | 3.188 |
| 2 1 0 | 3.137 | 3.113 | 3.126 | 3.079 | 3.098 |
| 2 1 1 | 2.863 | 2.842 | 2.854 | 2.811 | 3.828 |
| 1 1 2 | 2.828 | 2.808 | 2.820 | 2.777 | 2.793 |
| 3 0 0 | 2.767 | 2.745 | 2.757 | 2.716 | 2.732 |
| 2 0 2 | 2.677 | 2.658 | 2.669 | 2.628 | 2.644 |
| 3 0 1 | 2.573 | 2.554 | 2.565 | 2.526 | 2.541 |
| 2 1 2 | 2.337 | 2.320 | 2.330 | 2.294 | 2.308 |
| 3 1 0 | 2.302 | 2.284 | 2.294 | 2.259 | 2.273 |
| 2 2 2 | 1.778 | 1.963 | 1.971 | 1.941 | 1.953 |
| 3 1 2 | 1.924 | 1.910 | 1.918 | 1.889 | 1.900 |
| 2 1 3 | 1.873 | 1.860 | 1.868 | 1.839 | 1.850 |

【0046】ビリジン吸着量の測定は次の方法にて行なつた。

【0047】粒径 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ のヒドロキシアバタイト顆粒を加圧成形機を用いて軽く成形し、次にメノウ乳鉢で粉碎して $30 \sim 100$ メッシュの粒度とした。その 0.075 g を精秤し、管状試料管に充填し、窒素雰囲気下 100°C にて乾燥した。一方、 15.5°C の一定温度に保持した水浴中にビリジンを入れたバブラーを浸し窒素にてバーリングしてリアクター内に充填されたヒドロキシアバタイトに 100°C にて 15 分間ビリジンを吸着させた。その後、窒素流通下に徐々に昇温して 200°C に維持し、物理吸着分を脱離させ、水素イオン検知方式ガスクロマトグラフィーによりビリジンの脱離が検知されなくなつたのを確認し。次に、 $5^\circ\text{C}/\text{分}$ の昇温速度で 200°C から 950°C まで昇温し、脱離してくるビリジンの量をガスクロマトグラフィーにより定量した。この脱離ビリジン量をビリジン吸着量とした。

【0048】実施例2

実施例1と同一の原料を使用し、同一の反応条件で顆粒を調製し、これを 100°C で乾燥後 400°C で 3 時間焼成した。この顆粒の X 線回折法により求めた格子面間隔を表 2 に示す。

【0049】特性値は次の通りであつた。

【0050】(1) 単位格子定数；

$$a = 9.51 \text{ \AA}$$

$$c = 6.96 \text{ \AA}$$

(2) ビリジン吸着量； 0.0092 mmol/g

(3) Ca/P 比； 1.67

【0051】実施例3

実施例1と同一の原料を使用し、同一の反応条件で顆粒を調製した。これを 100°C で乾燥した後 700°C で 3 時間焼成した。この顆粒の X 線回折法により求めた格子面間隔を表 2 に示す。

30 【0052】特性値は次の通りであつた。

【0053】(1) 単位格子定数；

$$a = 9.55 \text{ \AA}$$

$$c = 6.99 \text{ \AA}$$

(2) ビリジン吸着量； 0.0038 mmol/g

(3) Ca/P 比； 1.67

【0054】比較例1

11 の三口フラスコに水酸化カルシウム懸濁液 (95% Ca(OH)_2) を 15.6 g と、水を 400 g とから成る。) を採り、これに窒素ガスを吹き込み、かつ強く攪拌しながら、リン酸水溶液 (85% H_3PO_4) を 13.8 g と、水を 400 g とから成る。) を徐々に添加した。リン酸水溶液の添加終了後、これに更にリン酸水溶液を添加して pH を 8.2 とし、オイルバスにセットし 90°C にて約 18 時間保持した。これを冷却した後、その一部を噴霧乾燥器 (スプレードライヤー) にかけ粒径 $1 \mu\text{m} \sim 10 \mu\text{m}$ の顆粒を得た。これを 100°C で乾燥しクロマトグラフィー分離用充填剤とした。この顆粒の X 線回折法により求めた格子面間隔を表 2 に示す。

【0055】特性値は、次の通りであつた。

50 【0056】(1) 単位格子定数；

$a = 9.41 \text{ \AA}$ $c = 6.88 \text{ \AA}$

(2) ピリジン吸着量 ; 0.0106 mmol/g

(3) Ca/P比 ; 1.67

【0057】比較例2

実施例1で使用した原料と同一の原料を使用し、同一の反応条件で処理して得られた1 μm ~10 μm の球状の顆粒を100°Cで乾燥後、空気存在下マツフル炉にて100°Cで3時間焼成した。この顆粒のX線回折法により求めた格子面間隔を表2に示す。

【0058】特性値は、次の通りであつた。

【0059】(1) 単位格子定数 ;

 $a = 9.46 \text{ \AA}$ $c = 6.92 \text{ \AA}$

(2) ピリジン吸着量 ; 0 mmol/g

(3) Ca/P比 ; 1.67

【0060】参考例

実施例1~3、比較例1~2で得られたヒドロキシアバタイトを使用してチトクロームCリゾチーム及びボバインシーラムアルブミン(BSA)混合物試料の分離を行なつた。クロマトグラフ一分離操作条件は次の通りである。

【0061】液体クロマトグラフ；ウォーターズ社製L

C244型

溶媒(グラジェント溶液)；リン酸ナトリウム水溶液(pH 6.8)

0.01モル~0.3モル/時グラジェント
流速 ; 0.8 ml/分試料量 ; 100 μl (但し実施例2のヒドロキシアバタイトを使用した場合は50 μl)検出器 ; 日本分光社製UVDEC-100-III
検出波長 280 nm

10 クロマトグラム記録 ; 記録紙速度2.5 mm/分

【0062】この結果を図1~図5に示す。これにより本発明によるヒドロキシアバタイトが、従来公知のヒドロキシアバタイトに比較して著しく優れた分離性能を有することが明らかである。

【0063】又、チトクロームCの分離における分離性能として理論段数を求めたところ表3に示す結果を得た。ここで理論段数とは、クロマトグラフにおける溶出時間(t_R)とクロマトグラフの半価幅とから次の式により求めたものである。20 【0064】 N (理論段数) = 16 (t_R/ω)²

【0065】

【表3】

表 3

| | 実施例 | | | 比較例 | |
|---------------------------|---------------------|--------|--------|--------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 |
| Ca/P比 | | | 1.67 | | |
| 単位格子定数 | | | | | |
| a (Å) | 9.58 | 9.51 | 9.55 | 9.41 | 9.46 |
| c (Å) | 7.01 | 6.96 | 6.99 | 6.88 | 6.92 |
| ピリジン吸着量 (mmol/g) | 0.0056 | 0.0092 | 0.0038 | 0.0106 | 0 |
| チトクロームC 分離における 理論段数 | (14,000 ~20,000) | 13,000 | 11,000 | 3,800 | 2,000 |

【0066】

【発明の効果】本発明に係るヒドロキシアバタイトは、特異な結晶特性を有し、特に生体高分子化合物、例えばタンパク質のクロマトグラフ一分離用カラム充填剤として有効であり、分離性能の大幅な向上を達成すること

ができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1のヒドロキシアバタイトによる液体クロマトグラムを示す図である。

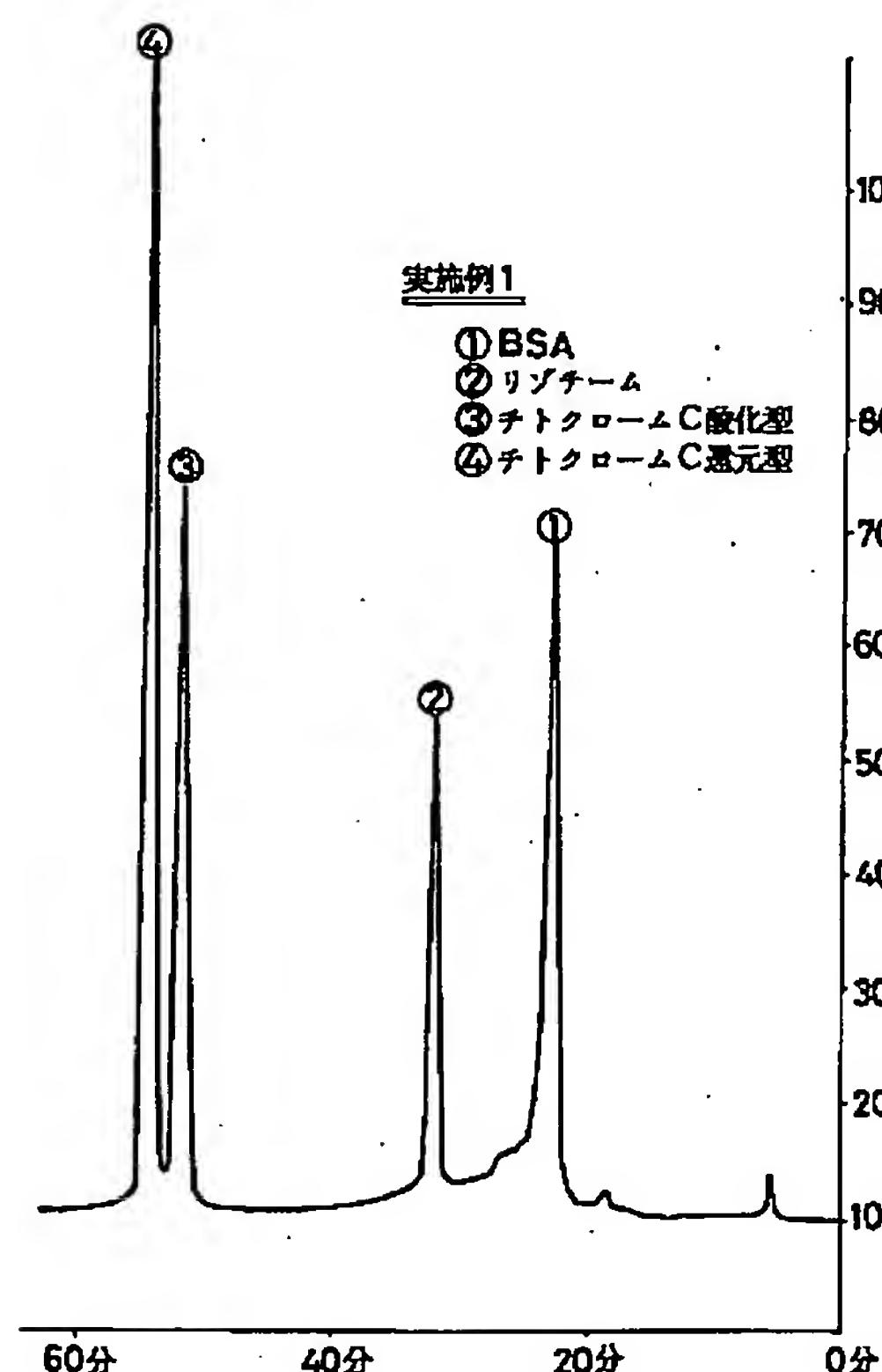
50 【図2】実施例2のヒドロキシアバタイトによる液体ク

ロマトグラムを示す図である。

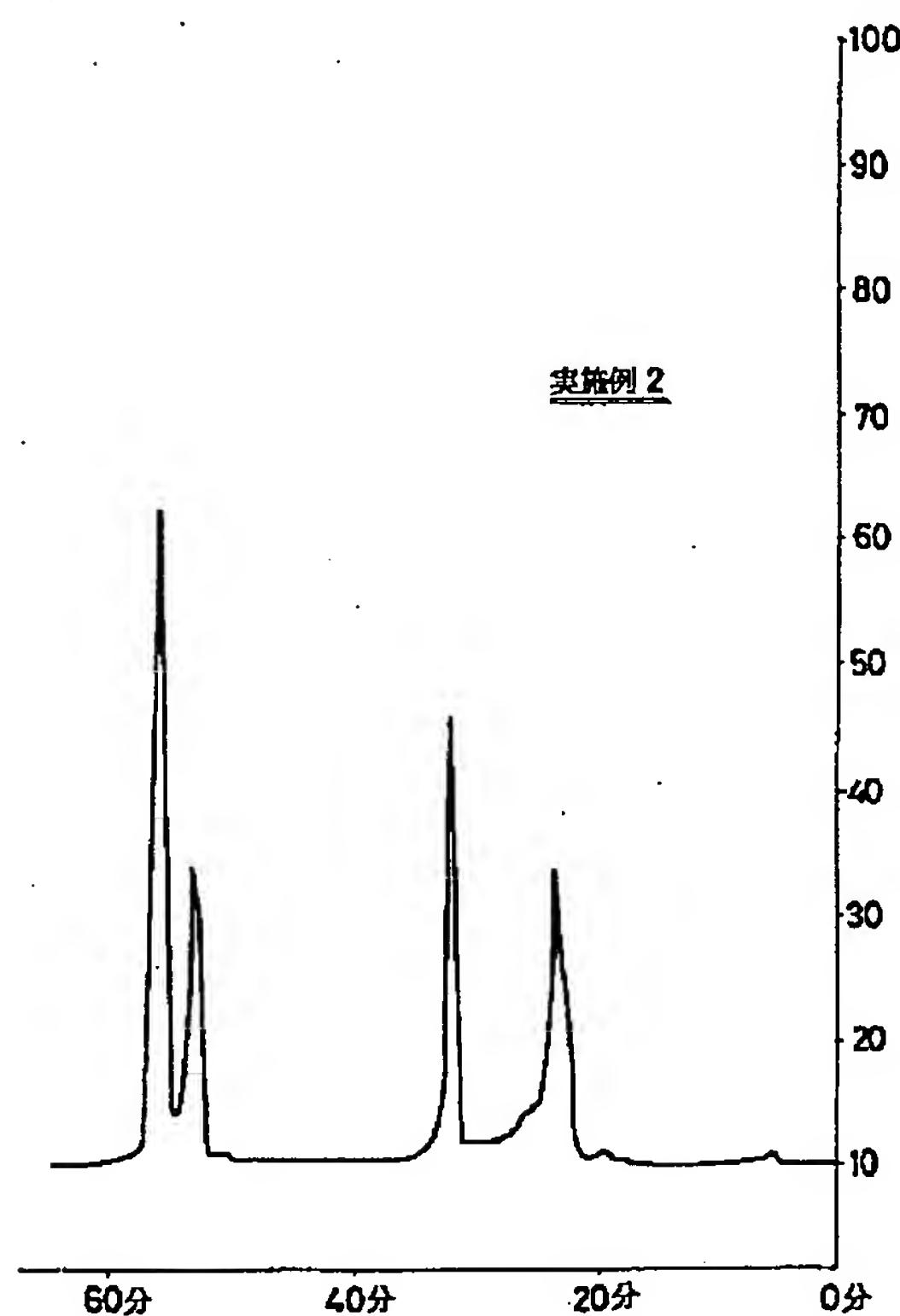
【図3】実施例3のヒドロキシアパタイトによる液体クロマトグラムを示す図である。

【図4】比較例1のヒドロキシアパタイトによる液体クロマトグラムを示す図である。

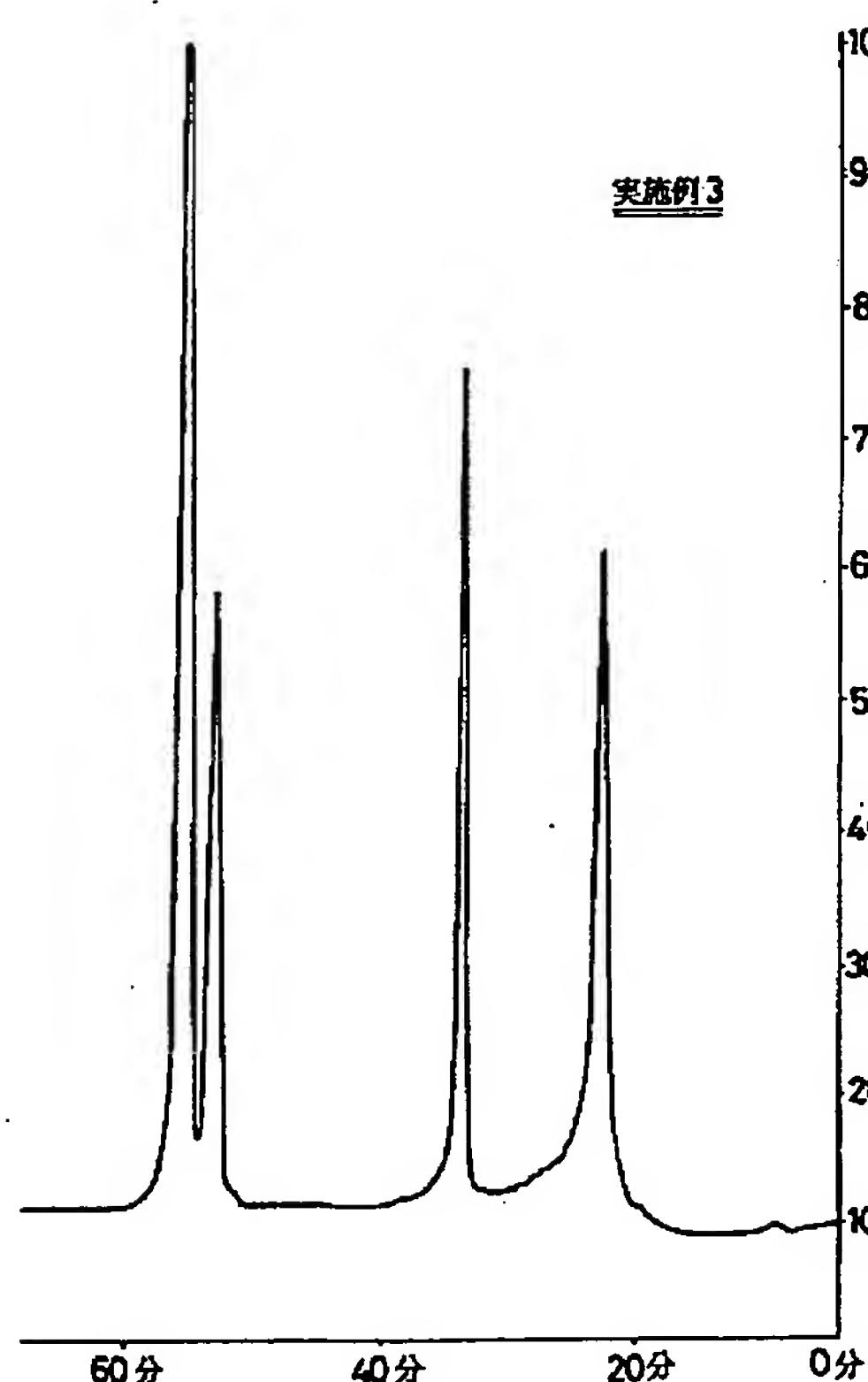
【図1】



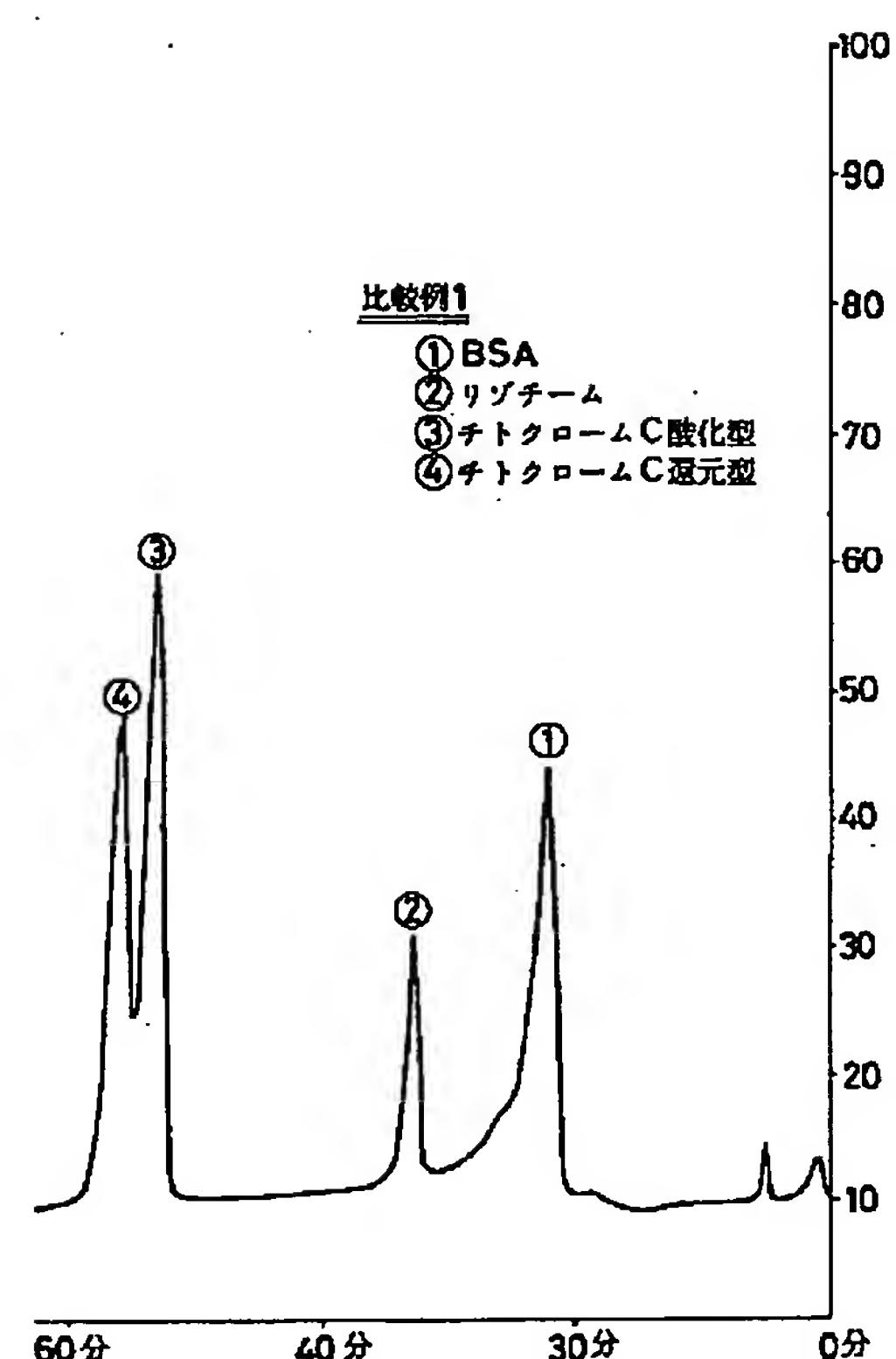
【図2】



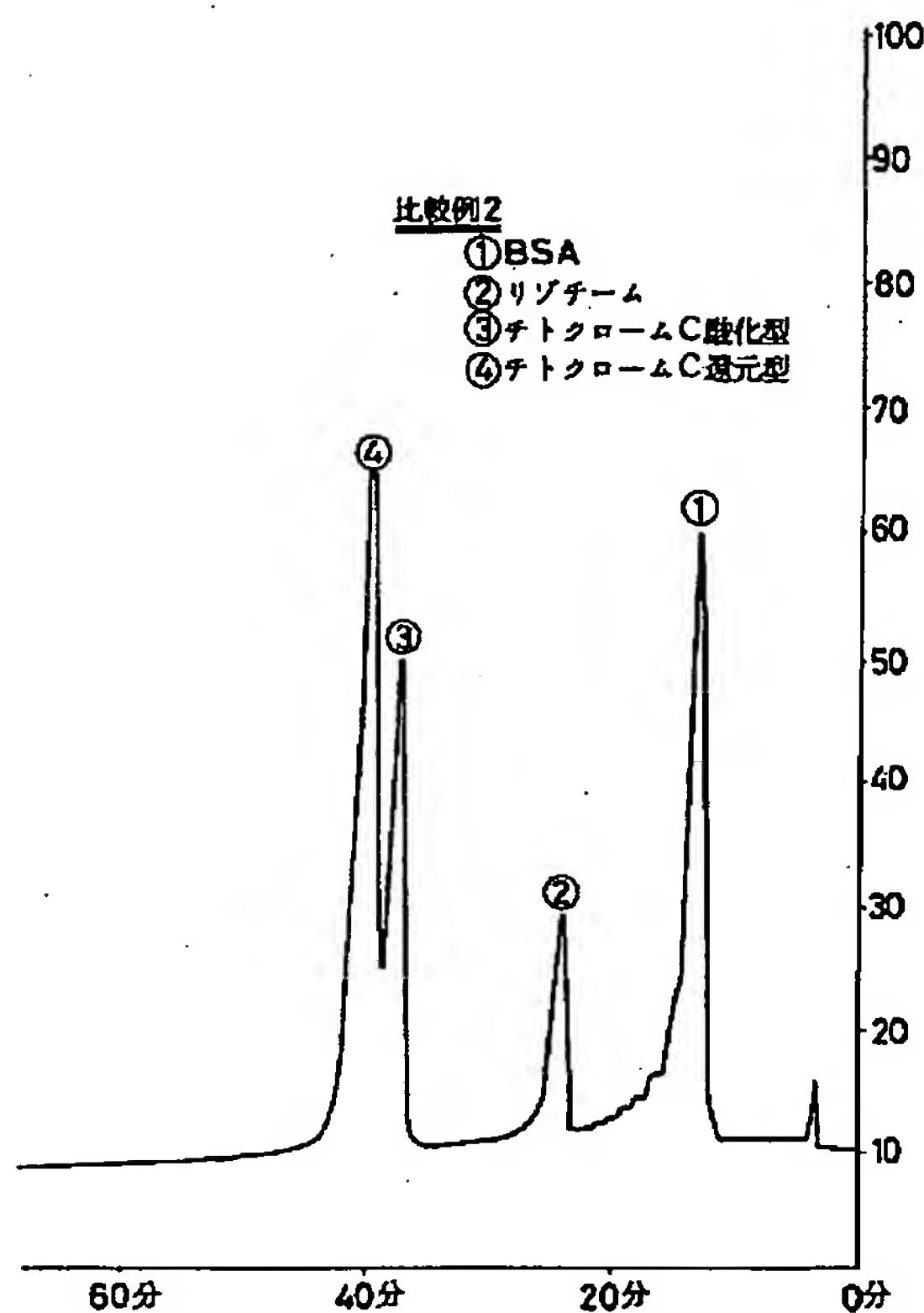
【図 3】



【図 4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 深町 圭子
東京都三鷹市上連雀9丁目21番1号
(72)発明者 前島 次男
埼玉県入間郡鶴ヶ島町脚折1428番地34

(72)発明者 石川 利弘
東京都世田谷区桜丘4-14-11
(72)発明者 小川 哲朗
東京都板橋区大山金井町38-5